

学校编码：10384

分类号_____密级_____

学号：B200226014

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

中国人肝脏 26S 蛋白酶体亚基间的相互作用

An interaction map of Chinese liver 26S proteasome subunits

作 者 姓 名：陈 川

指导教师姓名：陶 涛 教授

专 业 名 称：生物化学与分子生物学

论文提交日期：2006 年 月

论文答辩时间：2006 年 7 月 29 日

学位授予日期：

答辩委员会主席：杨晓明 教授

评 阅 人：_____

2006 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：陈 川

2006 年 7 月 29 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 二 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“ ”）

作者签名：陈川

日期：2006 年 7 月 31 日

导师签名：陶涛

日期：2006 年 7 月 31 日

摘要

泛素-蛋白酶体通路介导的细胞蛋白降解是一个复杂、缜密的过程，这种有高度选择性的蛋白质降解途径在细胞周期、基因转录及表达、抗原递呈等方面发挥重要的调控作用。但是到目前为止，对于泛素-蛋白酶体通路形成的分子机理及功能还不是很清楚。26S 蛋白酶体是由多个亚基组成的复合体，这个复合体是两部分组成，一部分是 20S 降解复合体，另一部分是 20S 降解复合体（CP）两端的 19S 调节复合体（RP）。20S 降解复合体是底物蛋白质的水解中心，由 7 个 α 亚基和 7 个 β 亚基，组成 $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$ 的桶状结构。在哺乳动物细胞中还有 3 个可以被干扰素（ $\text{IFN}\gamma$ ）诱导的 β 亚基， β_{1i} ， β_{2i} ， β_{5i} ，可以替换 β_1 ， β_2 ， β_5 形成免疫蛋白酶体，主要在抗原递呈中起作用。19S 调节复合体至少有 17 个亚基组成，包含两个亚结构，分别是“盖子”（lid）和“基底部”（base）。“盖子”是由一些 non-ATPase 酶活性的亚基组成，“盖子”能识别泛素化的底物，把底物带入 26S 蛋白酶体中，并且能使泛素化的底物去泛素，对泛素进行再循环；“基底部”由 6 个具有 ATPase 酶活性的亚基和 3 个 non-ATPase 酶活性的亚基组成，主要功能是使底物蛋白去折叠和变性，使底物蛋白质进入 20S 降解复合体，进行底物蛋白质的水解。

肝脏是人体的第一大器官，是物质代谢、能量转换及供应的枢纽，在人类生命活动中占有重要地位。构建人肝脏细胞的蛋白质网络图谱，对了解肝脏疾病的发生机理和治疗有着重大的意义。

我们通过 RT-PCR 的方法，从人肝脏组织中获得 26S 蛋白酶体亚基的全长 ORF，把这些亚基 ORF 分别克隆到酵母双杂交的载体上，转入酵母 *S.cerevisiae* AH109 中进行亚基间相互作用分析。我们总共得到了 34 个 26S 蛋白酶体亚基的全长 ORF，检测了 1156 对 26S 蛋白酶体亚基间相互作用实验，观察到 112 对阳性结果，其中有 18 对亚基间的相互作用是双向的；同时我们使用 GST-pull down 的方法，验证了将近 10% 的酵母双杂交实验结果；还把表达不同的荧光标记的相互作用亚基共转染到 HeLa 细胞中，观察亚基的共定位。我们在不同系统中验证 26S 蛋白酶体亚基间的相互作用，证明了我们的实验结果。我们酵母双杂交阳性结果的 41% 是在原来文献中有报道的，这更加证明了我们结果的正确性。同时我

们还得到一些新型的 26S 蛋白酶体亚基间相互作用，这为了解人 26S 蛋白酶体的功能奠定了基础。

关键词： 中国人肝脏；26S 蛋白酶体；26S 蛋白酶体亚基；相互作用；

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

The 26S proteasome is a multi-subunit protein complex commonly available in most eukaryotic cells. It is responsible for the degradation of many cellular proteins, for example the cell cycle protein, oncogene product and MHC-restricting antigen. As a result, it plays a very important role in some cellular process, such as the regulation of cell cycle, cell apoptosis, antigen presentation, gene transcription and so on. The 26 S proteasome complex is composed of two subcomplexes, the 20 S catalytic particle and the 19 S regulatory particle. The 20 S particle has a cylinder-shaped structure containing four stacked heptameric rings that form the proteolytic chamber. The 20 S cylinder is capped on both sides by a 19 S particle to form the 26 S proteasome. The 19 S particle is composed of at least 17 proteins that form two subcomplexes; the “base” complex is composed of six AAA family of ATPases and three other proteins, and the “lid” complex is composed of eight non-ATPase proteins. It is generally believed that the 19 S particle plays two major roles in facilitating protein degradation by the 20 S particle. The first is to recognize and position ubiquitinated protein substrates, and the second is to unfold the protein substrates so that they can be inserted to the proteolytic chamber of the 20 S catalytic particle. How these events occur in the 19 S particle is unclear, and how the individual subunits participate in the regulatory functions also remains unknown.

Human liver is a most important part of human tissue, it play the pivot role in human activities. The proteasome interaction maps of human liver are very important to analysis and cure the human liver disease.

In this work, proteasome subunit ORFs were isolated from the liver tissues of Chinese people and constructed into the yeast two-hybrid plasmids. Then the yeast two-hybrid system was applied to detect the interactions between 26S proteasome subunits. We obtained 34 proteasome subunit ORFs. After screening 1156 subunit interactions, we obtained 112 positive interactions, about 10% of which were verified by *in vivo* binding assay. We also transfected different subunits with the different

fluoresce tag into the HeLa cells and observed the co-localization of interacting subunits. 41% of our obtained 26S proteasome interactions have been reported previously. We also obtained many novel 26S proteasome interactions. Our results implied some mechanism of the formation of the 26S proteasome complex.

Key words: Chinese Human liver; 26S proteasome; Yeast two-hybrid; Subunit interaction

目 录

第一部分 引言

1. 文献综述

1.1 泛素-蛋白酶体系统的组成.....	1
1.2 与泛素-蛋白酶体途径有关的生理功能.....	7
1.3 26S 蛋白酶体的生物发生.....	8
1.4 26S 蛋白酶体的细胞定位.....	12
1.5 人类蛋白质组计划.....	13
1.6 酵母双杂交.....	14
1.7 研究简介.....	16

第二部分 材料与方法

2. 实验材料

2.1 主要材料与试剂.....	17
2.2 仪器设备.....	18
2.3 常用溶液的配制.....	19

3. 实验方法

3.1 从肝脏组织中提取总 RNA.....	28
3.2 以肝脏组织总 RNA 为模板进行 RT-PCR.....	29
3.3 PCR 引物设计和合成	29
3.4 PCR 扩增目的片段.....	33
3.5 SDS 碱裂解法小量制备质粒 DNA.....	34
3.6 制备感受态大肠杆菌的 Inoue 方法.....	35
3.7 大肠杆菌转化步骤.....	35
3.8 质粒构建.....	35
3.9 酵母双杂交实验.....	39
3.10 SDS-PAGE 和 Western Blot.....	41

3.11 蛋白的表达和纯化.....	43
3.12 体外结合实验.....	45
3.13 细胞实验方法.....	47

第三部分 实验结果

4. 人类肝脏 26S 蛋白酶体亚基因全长 ORF 的获得

4.1 人肝脏 26S 蛋白酶体亚基 ORF 的克隆.....	53
4.2 酵母双杂交系统的建立.....	55
4.3 人 26S 蛋白酶体亚基基因重组质粒可以在酵母菌 <i>S. cerevisiae</i> AH109 中正常表达.....	57
4.4 26S 蛋白酶体亚基之间相互作用.....	58

5. 体外结合实验验证亚基之间的相互作用

5.1 pGEX4T-2 和 PET28-a 重组质粒的构建.....	68
5.2 pGEX4T-2 和 PET28-a 重组质粒在 BL21 中表达.....	70
5.3 GST 融合蛋白的纯化.....	72
5.4 体外结合实验.....	73

6. 26S 蛋白酶体亚基在 HeLa 细胞中共定位

6.1 26S 蛋白酶体亚基多克隆抗体的制备.....	75
6.2 26S 蛋白酶体亚基在 HeLa 细胞中共定位.....	79

第四部分 讨论与结论

7. 讨论

7.1 26S 蛋白酶体亚基之间的相互作用及生物意义.....	89
7.2 不同生物的 26S 蛋白酶体亚基间相互作用比较.....	101
7.3 26S 蛋白酶体的细胞内分布及共定位.....	107
7.4 展望.....	108

8. 结论

参考文献

致谢

Table of Contents

1. Introduction

1.1 26S proteasome.....	1
1.2 Physical function of 26s proteasome.....	7
1.3 Biogenesis of 26S proteasome.....	8
1.4 Localization of 26S proteasome	12
1.5 Human proteome.....	13
1.6 Yeast two-hybrid.....	14
1.7 Research introduction.....	16

2. Materials

2.1 Materials.....	17
2.2 Apparatuses.....	18
2.3 Solutions.....	19

3. Methods

3.1 Extract the total RNA from human liver.....	28
3.2 RT-PCR.....	29
3.3 Primers design	29
3.4 PCR of 26s proteasome.....	33
3.5 Plasmids isolation	34
3.6 <i>E.coli</i> competent cell.....	35
3.7 <i>E.coli</i> transformation.....	35
3.8 Plasmids construction.....	35
3.9 Yeast two-hybrid.....	39
3.10 SDS-PAGE and Western-Blot.....	41
3.11 Purification of recombinant protein.....	43
3.12 <i>In vitro</i> binding assay	45
3.13 Cell experiments.....	47

4. Identification of protein-protein interactions of Chinese liver 26S

proteasome subunit in a yeast two-hybrid system

4.1 RT-PCR of 26S proteasome subunit ORF.....	53
4.2 The construction of recombinant plasmids for yeast two-hybrid.....	55
4.3 The expression of recombinant plasmids in <i>S.cerevisiae</i> AH109.....	57
4.4 Yeast two-hybrid analysis of 26S proteasome subunits	58

5. *In vitro* binding assay of protein-protein interactions of Chinese liver 26S proteasome

5.1 The construction of recombinant plasmids for in vitro binding assay.....	68
5.2 The expression of recombinant plasmids.....	70
5.3 In vitro binding assay.....	72

6. The distribution of 26s proteasome subunits in HeLa cells

6. 1 Antibody preparation against PSMA9 and PSMA3 of 26S proteasome.....	73
6.2 The distribution of 26S proteasome subunit in HeLa cell.....	75
6.3 Co-localization	79

7. Discussion

7.1 The interaction within 26S proteasome and its biological function.....	89
7.2 Comparison of 26S proteasome subunit interactions of different orginsm.....	101
7.3 The distribution of 26s proteasome subunit in HeLa cell.....	107
7.4 Perspective.....	108

8. Conclusions

References

Acknowledgements

第一部分 前言

1. 文献综述

以色列科学家 Aaron Ciechanover, Avram Herskho 和美国科学家 Irwin Rose 发现了泛素调节的蛋白降解途径, 从而获得了 2004 年的诺贝尔化学奖。

随着对泛素-蛋白酶体通路的深入研究, 发现该通路介导的细胞蛋白降解是一个复杂、缜密的调控过程, 是细胞调控的重要机制。这种有高度选择性的蛋白质降解途径在细胞周期、基因转录及表达、抗原提呈等方面发挥调控作用。随着研究的深入, 人类的许多疾病与泛素-蛋白酶体通路有关, 人们把泛素-蛋白酶体途径的酶作为药物设计的分子靶位, 进行抗肿瘤、抗炎症药物的研究^[1]。

1.1 泛素-蛋白酶体系统的组成

1.1.1 泛素系统

在真核生物细胞中, 泛素-蛋白酶体通路是蛋白质选择性降解的主要方式, 它能催化泛素 (ubiquitin, Ub) 共价地结合在靶蛋白上, 随后靶蛋白被依赖 ATP 的 26S 蛋白酶体选择性降解成短肽。Ub 首先被 Ub 活化酶 (ubiquitin activating enzymes, E1) 活化 Ub 上 76 位的 Gly 与 E1 上的色氨酸 Cys 残基形成高能硫酯键连接在一起; 然后通过转酯作用, Ub 从 E1 转移到 Ub 结合酶 (ubiquitin conjugating enzymes, E2) 上的色氨酸 Cys; 活化的 Ub 再从 E2 转移到底物特异性的 Ub 连接酶 (ubiquitin ligase enzymes, E3) 色氨酸 Cys 残基上; 接着通过形成底物-E3 复合物 (substrate-E3 complex), 使底物发生 Ub 化即多个 Ub 分子通过异肽键 (isopeptide bond) 结合在靶蛋白上, 形成分支状的多聚 Ub 链, 然后连有 Ub 的底物被 26s 蛋白酶体识别, 进入从而被降解^[1, 2, 3] (图 1.1)。

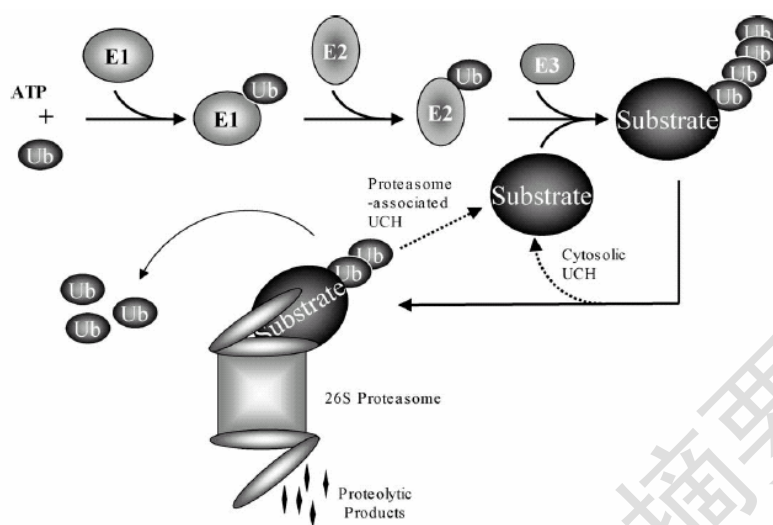


图 1.1 泛素降解途径简图^[2]

Fig1.1 The protein ubiquitination and proteolytic pathway

泛素连接酶 E3 通过调控蛋白的泛素化过程从而参与细胞内的多种生理过程。所有的 E3 具有连接靶蛋白和特定 E2 的能力。蛋白质特定翻译后的修饰经常作为其相应的泛素连接酶 E3 识别的标志。例如：泛素连接酶 SCF^{cdc4} 识别细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 CDK (cyclin-dependent kinase)，抑制子 Sic1 就需要在其特定位点的磷酸化，否则不能被 E3 识别从而不能通过泛素途径降解。这可能导致生物体不能对细胞周期进行精确调控，引起某些细胞组织或器官发生癌变。现在发现的泛素连接酶 E3 主要有两大类：HECT (homologous to E6-AP carboxyl terminus) 结构域家族和 RING (the really interesting gene) 结构域家族。HECT 结构域主要功能是使泛素形成催化作用所必需的硫酯键，而 RING 结构域为 E2 和底物提供居留位点从而使 E2 催化泛素转移到底物上^[4]。E1, E2, E3, 只能使蛋白底物加上有限的泛素，只有 E4 酶才能把蛋白底物多泛素化^[5]。

泛素在不同位点的延伸,有着不同的生物功能。多聚泛素化通过泛素的 Lys-48, 和 Lys-29 连接, 这种连接可作为蛋白酶体的降解信号; 但在泛素 Lys-63 连接可作为 DNA 修复和转录因子活化的信号^[6]。泛素化除了有多聚泛素化还有单泛素化, 单泛素化修饰也是一种调节信号, 可以引起靶蛋白的活性、定位以及蛋白质结构的改变, 从而对蛋白质的胞吞途径、膜泡的出芽、组蛋白的修饰、基因的转录以及蛋

白质核内的定位进行调节^[7]。

1.1.2 蛋白酶体系统

26S 蛋白酶体分子由催化颗粒(catalytic particle, CP)和调节颗粒 (regulatory particle, RP) 组成, 见图 1.2。CP 又称 20 S 降解复合体, RP 又称 19 S 调节复合体, PA700。20 S 复合体的两侧各有一个 19 S 复合体, 在某些情况下还有杂交的蛋白酶体, 一侧为 19 S 复合体, 而另一侧为 11s 复合体^[12]。26S 蛋白酶体亚基命名见表 1.1。

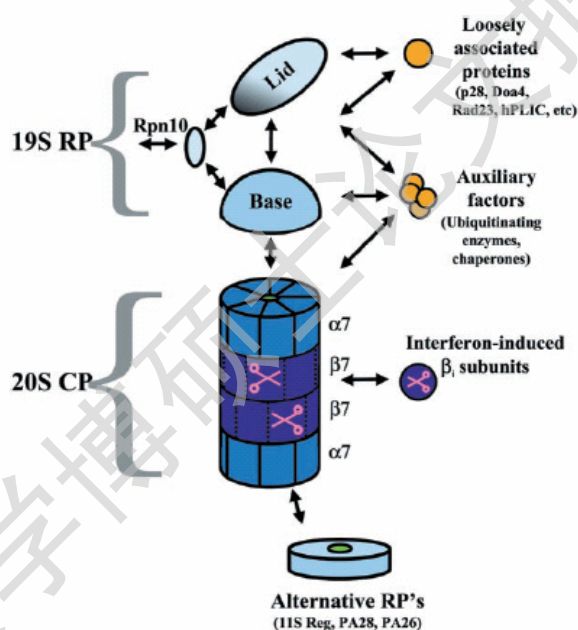


图 1.2 26s 蛋白水解小体的结构模拟图^[3]

Fig1.2 Structure of the proteasome

1.1.2.1 CP 的结构

20S 复合体外形呈筒状, 由内层 2 个 β 环和外层 2 个 α 环组成, 每个环含 7 个不同的亚基, 基本结构为 $\alpha 7 \beta 7 \beta 7 \alpha 7$ 。人类存在 10 个不同的 β 亚基和 7 个不同的 α 亚基。只有 CP 具有蛋白质水解功能, 底物的降解主要由它来完成。起催化作用的亚基只有 $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$, 并且这三种亚基在 γ 干扰素 ($\text{INF } \gamma$) 诱导下,

被 $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ 亚基替代, 形成免疫蛋白酶体, 和抗原递呈有关。 β 亚基的活性位点是 N 端的保守残基苏氨酸 (Thr), 不同生物的 β 亚基 N 端的保守残基见图 1.3。当 β 亚基 N 端前导肽被切除后, Thr 就被暴露出来, 它模拟了丝氨酸蛋白酶的催化过渡态, 虽然 $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ 亚基的活性位点都是 Thr 残基, 但是不同的 β 亚基其催化活性各不相同, 因此蛋白酶体具有多种水解活性, 如类糜蛋白酶活性, 类胰蛋白酶活性, 谷氨酰胺水解酶活性和支链氨基酸胺酶活性等^[4]。

<i>Thermoplasma acidophilum</i>	
β	MNQTLETGT ¹ TTVG
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	
$\beta 1$	MTADRPALRTGDRDTRLSPGSLSSFTDYLRGHAPKLLPSTRIGERSHSTROGDQMESGDLAPHGT ¹ TIVA
$\beta 2$	MTVDR-APRITDGDTRLSPGSLSSFTSEYLRVHAPKLLPQSRFAUT-----GGVVMGGGDVAPHGT ¹ TIVA
human	
MB1/X	...PEEPQIEMLHGT ¹ TTLA
LMP7	MALLDVCGAPRQRPESALPVAGSGRRSDPGHYSFSMRSPEDALPRGMQPTTEFFQSLGGDGERNVQIEMAHGT ¹ TTLA
HsDelta/Y	MAATLLAARGAGAPAPANGPEAFTPDWESREVSTGT ¹ TIMA
LMP2	MLRAGAPTGDLPAGEVHTGT ¹ TIMA
Z	MAAVSVYAPFVGGFSFDNCRNAVLEADFAKRGYKLPKVRKTGT ¹ TIAG
MECL1	MLKPALEPRGGFSFENCQRNASLERVLP--GLKVPHAKTGT ¹ TIAG
HsBPROS26	KEATLQSRSGQLNAGQAPQGFYRIPSTPDSEFMDPASALYRGPITRIQNEFMVIGTSVLG
HsC5	MLSSSTAMYSAPGRDLGMEPHRAAGPLQLRFPSPYVPNGGTILA
HsC7-I	MEYLLIG
HsC10-II	MSIMSYNGGAVMA

图1.3 不同生物蛋白酶体的 β 亚基前导肽序列^[47, 48]

Figure1.3 N-terminal amino acid sequences of bacterial and human b-type subunits.

表 1.1 26S 蛋白酶体亚基在不同生物中命名表

Table1.1 Nomenclature of 26S proteasome subunits

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. elegans</i>	<i>H. sapiens</i>	GDB symbol
20S α -type				
α 1	Prs2	PAS-1	Pros27 (Iota)	PSMA6
α 2	Prs4	PAS-2	HC3	PSMA2
α 3	Prs5	PAS-3	HC9	PSMA4
α 4	Pre6	PAS-4	XAPC7-S (L)	PSMA7
α 5	Pup2	PAS-5	Zeta	PSMA5
α 6	Pre5	PAS-6	HC2 (Pros30)	PSMA1
α 7	Prs1	PAS-7	HC8	PSMA3
20S β -type				
β 1	Pre3	PBS-1	Y (Delta)	PSMB6
β 2	Pup1	PBS-2	Z	PSMB7
β 3	Pup3	PBS-3	HC10	PSMB3
β 4	Pre1	PBS-4	HC7	PSMB2
β 5	Pre2	PBS-5	X (MEI)	PSMB5
β 6	Prs3	PBS-6	HC5	PSMB1
β 7	Pre4	PBS-7	HN3	PSMB4
β 1i	-	-	LMP2	PSMB9
β 2i	-	-	MECL1	PSMB10
β 5i	-	-	LMP7-E1 (E2)	PSMB8
19S ATPase				
S7/Rpt1	Cim5	RPT-1	MSS1 (S7)	PSMC2
S4/Rpt2	Yta5	RPT-2	S4 (p56)	PSMC1
S6b/Rpt3	Yta2	RPT-3	TBP7 (S6/p48)	PSMC4
S10b/Rpt4	Sug2	RPT-4	p42	PSMC6
S6a/Rpt5	Yta1	RPT-5	TBP1	PSMC3
S8/Rpt6	Sug1	RPT-6	p45 (S8/TRIP1)	PSMC5
19S non-ATPase				
S2/Rpn1	Hrd2	RPN-1	p97	PSMD2
S1/Rpn2	Sen3	RPN-2	p112	PSMD1
S3/Rpn3	Sun2	RPN-3	p58	PSMD3
Rpn4	Son1			
p55/Rpn5	Nas5	RPN-5	p55	PSMD12
S9/Rpn6	Nas4	RPN-6	p44.5	PSMD11
S10a/Rpn7	Rpn7	RPN-7	p44	PSMD6
S12/Rpn8	Nas3	RPN-8	p40	PSMD7
S11/Rpn9	Nas7	RPN-9	p40.5	PSMD13
S5a/Rpn10	Sun1	RPN-10	S5a	PSMD4
S5b			p50.5	PSMD5
S13/Rpn11	Mpr1	RPN-11	S13	PSMD14
S14/Rpn12	Nin1	RPN-12	p31	PSMD8
Rpn13	Rpn13			
p28			p28	PSMD10
p27	Nas2		p27	PSMD9

参考[46], GDB: Human Genome Database

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库